

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 G01N 33/92	A1	(11) 国際公開番号 WO98/47005 (43) 国際公開日 1998年10月22日(22.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03663 (22) 国際出願日 1997年10月13日(13.10.97) (30) 優先権データ 特願平9/111944 1997年4月14日(14.04.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) デンカ生研株式会社(DENKA SEIKEN CO., LTD.)(JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋茅場町3丁目4番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松井寛史(MATSUI, Hiroshi)(JP/JP) 水野和重(MIZUNO, Kazushige)(JP/JP) 伊藤康樹(ITO, Yasuki)(JP/JP) 小原秀一(OHARA, Shuichi)(JP/JP) 藤原 明(FUJIWARA, Akira)(JP/JP) 高杉憲一(TAKASUGI, Kenichi)(JP/JP) 〒959-16 新潟県五泉市大字木越字鏡田1359-1 デンカ生研株式会社 鏡田工場内 Niigata, (JP) 岡田正彦(OKADA, Masahiko)(JP/JP) 〒951 新潟県新潟市白山浦1-315 Niigata, (JP)		(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CN, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR QUANTITATING CHOLESTEROL PRESENT IN LOW DENSITY LIPOPROTEINS (54)発明の名称 低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法 (57) Abstract A method whereby LDL cholesterol can be conveniently fractionated and quantitated without resort to any complicated centrifuging procedure. This method comprises the first step of eliminating from a specimen high density lipoproteins, very low density lipoproteins and cholesterol present in chylomicrons and the second step of quantitating the cholesterol remaining in the specimen.		

(57)要約

煩雑な遠心分離操作を要せず、LDLコレステロールを簡便に分別定量する方法が開示されている。本発明の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法は、被検試料中の高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白及びカイロミクロン中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

1

明細書

低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法

技術分野

本発明は、動脈硬化症の臨床診断に重要な低密度リポ蛋白（LDL）中のコレステロール（以下、「LDLコレステロール」ということがある。本明細書において単に「コレステロール」という場合にはエステル型コレステロール及び遊離型コレステロールの両者を包含する）の分別定量法に関する。

背景技術

LDLは血液中におけるコレステロール運搬の主役であり粥状動脈硬化において血管壁に沈着したコレステロールは主にLDLに由来している。血漿におけるLDLの増加は虚血性心疾患等の粥状硬化性疾患の主要な危険因子の1つであり、LDLコレステロールを分別定量することは臨床的に有用である。

従来のLDLコレステロールの定量法は、分画操作とコレステロール定量操作の2段階から求める方法と血中の総コレステロール、HDL中のコレステロール、トリグリセリドをそれぞれに求めるFriedewaldの式により算出する方法がある。

分画操作には、超遠心法、沈殿法、免疫化学的方法等がある。超遠心法を用いる場合には、比重の差を利用して超遠心分離機によりLDLを分離し、そのコレステロール量を測定するものである。沈殿法はHDL抗体、ポリアニオン及び2価の陽イオンを添加し、不溶性沈殿物を生成させて遠心分離により上清中のLDLコレステロールを定量する方法（WPI Acc No. 85-116848/20）である。免疫化学的方法はHDL、VLDL、CMに対する抗体をラテックスに結合させ、凝集反応後に遠心又はフィルタにより取り除き、LDLコレステロールを定量する方法（WPI Acc No. 84-301275/49）が報告されているが、いずれも簡便性や経済性に問題がある。

Friedewaldの式では総コレステロールからHDLコレステロールを引き、さらにトリグリセリドの1/5量を引きLDLコレステロールを求める。しかし、食事の影響や個体差を加味していないため正確性に問題がある。

また近年、分画操作を要しないLDLコレステロールの定量法（WPI Acc No. 83-

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

2

766269/38)が報告されているが、LDLに対する特異性が不十分である。

発明の開示

本発明の課題は、煩雑な遠心分離操作を要せず、LDLコレステロールを簡便に分別定量する方法を提供することである。

- 5 本願発明者らは第1工程で低密度リポ蛋白中のコレステロール以外のコレステロールを消去し、続く第2工程において残存するコレステロールを測定することにより、低密度リポ蛋白中のコレステロールを定量することができることを見出し本願発明を完成した。

- すなわち、本発明は、被検試料中の高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白及びカイロミクロン中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、低密度リポ蛋白、高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白及び／又はカイロミクロンを含むかもしれない被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法を提供する。

- 15 本発明により、煩雑な遠心分離操作を要せず簡便にLDLコレステロールを分別定量する方法が提供された。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1におけるLDLコレステロールの測定結果と、Friedewald算出値との相関関係を示す図である。

- 20 図2は、実施例2におけるLDLコレステロールの測定結果と、Friedewald算出値との相関関係を示す図である。

図3は、実施例4においてHDL、VLDL及びCM非存在下及び存在下におけるLDLコレステロール濃度と本発明の方法により測定された吸光度との相関関係を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 25 リポ蛋白中に含まれるコレステロールとしては、エステル型コレステロール（コレステロールエステル）及び遊離型コレステロールがある。本明細書において、単に「コレステロール」という場合には、これらの両者を包含する。

本発明の方法に供される被検試料としては、HDL、LDL、VLDL及びCM

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

3

等のリポ蛋白を含むかもしれない試料であればいずれのものでもよく、例えば、血液、血清、血漿等の体液やその希釈物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

本発明の方法は、第1工程及び第2工程から成り、第1工程では被検試料中のHDL、VLDL及びCM中のコレステロールを消去し、続く第2工程では、被検試料中の残存コレステロールを定量する。第1工程でHDL、VLDL及びCM中のコレステロールが消去されているので、第2工程で定量されるコレステロールは、主として被検試料中のLDL中のコレステロールである。

第1工程における「消去」とは、コレステロールを分解し、かつ、その分解産物が次の第2工程で検出されないようにすることを意味する。LDL以外のリポ蛋白、すなわち、HDL、VLDL、CM等に含まれるコレステロールを選択的に消去する方法としては以下の方法を挙げることができる。

すなわち、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤の存在下において、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を消去する。

過酸化水素を消去する方法としては、カタラーゼを作用させて水と酸素に分解する方法、及びペルオキシダーゼを用いてフェノール系又はアニリン系水素供与体化合物と過酸化水素を反応させて無色キノンに転化する方法を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

第1工程の反応液中のコレステロールエステラーゼ濃度は0.2～1.0 U/ml程度が好ましく、由来としてはシュドモナス属細菌から生成されるものが効果的である。また、コレステロールオキシダーゼの濃度は0.1～0.7 U/ml程度が好ましく、細菌や酵母由来のものを用いることが好ましい。さらに、カタラーゼの濃度は40～100 U/ml程度が好ましい。また、過酸化水素を無色キノンへ転化する場合のペルオキシダーゼの濃度は0.4～1.0 U/mlが好ましく、フェノール系又はアニリン系水素供与体化合物の濃度としては0.4～0.8 mmol/Lが好ましい。

第1工程で用いられる、LDL以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤の好ましい

WO 98/47005

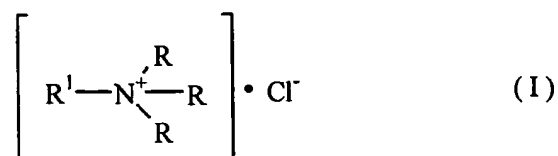
PCT/JP97/03663

4

例として、HLB値が13以上15以下、好ましくは13以上14以下であるポリアルキレンオキサイド誘導体を挙げるができる。誘導体の例としては高級アルコール縮合物、高級脂肪酸縮合物、高級脂肪酸アミド縮合物、高級アルキルアミン縮合物、高級アルキルメルカプタン縮合物、アルキルフェノール縮合物を挙げるこ
 5 ことができる。なお、界面活性剤のHLB算出方法は周知であり、例えば「新界面活性剤」、堀内博著、昭和61年、三共出版に記載されている。

HLB値が13以上15以下のポリアルキレンオキサイド誘導体の好ましい具体例としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン
 10 ノニルフェニルエーテル等でHLB値が13以上15以下の化合物を挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

また、第1工程で用いられる界面活性剤として陽イオン界面活性剤を用いることもできる。この場合の陽イオン界面活性剤としては、下記一般式(Ⅰ)で示される、
 15 第4級アンモニウム塩を親水基として有するものが好ましい。



ただし、式(Ⅰ)中、Rは互いに独立に、炭素数1～8の直鎖状のアルキル基を示し、R¹は炭素数3～20のアルケニル基を示す。

第1工程で用いられる上記界面活性剤の濃度は、0.1～10g/l程度が好ま
 20 しく、さらに好ましくは0.5～5.0g/l程度である。

第1工程は、pH5～8の緩衝液中で行うことが好ましく、緩衝液としてはトリス、トリエタノールアミン、グットの緩衝液等のアミンを含む緩衝液が好ましい。特にグット緩衝液であるBis-Tris、PIPES、MOPSO、BES、H
 25 EPES及びPOPISOが好ましく、緩衝液の濃度は10～500mM程度が好ましい。

第1工程で、LDLとの反応を抑え、他のリポ蛋白の消去をさらに高めるために、

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

5

反応液中に2価の金属イオンを含ませてもよい。2価の金属イオンとしては銅イオン、鉄イオン及びマグネシウムイオンを使用することができるが、特にマグネシウムイオンが好ましい。2価の金属イオンの濃度は5～200mM程度が好ましい。

5 なお、第1工程の反応液中には、任意的に、リポ蛋白分解酵素を加えることもできる。この酵素を加えることにより、特にVLDL中のコレステロールが反応しやすくなるので好ましい。この酵素の反応液中濃度は、5.0～10.0U/ml程度が好ましい。

第1工程の反応温度は25～40℃程度が適当であり、37℃が最も好ましい。また、反応時間は2～10分間程度でよい。

10 続く第2工程では、被検試料中の残存コレステロールを定量する。これは、例えば、少なくともLDLに作用する界面活性剤を加え、第1工程で加えたコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することにより行なうことができる。ここで、少なくともLDLに作用する界面活性剤は、LDLのみに選択的に作用する界面活性剤でもよいし、全てのリポ
15 蛋白に作用する界面活性剤であってもよい。

全てのリポ蛋白に作用する界面活性剤の好ましい例として、HLB値が11以上13未満、好ましくは12以上13未満であるポリアルキレンオキサイド誘導体を挙げるができる。誘導体の例としては高級アルコール縮合物、高級脂肪酸縮合物、高級脂肪酸アミド縮合物、高級アルキルアミン縮合物、高級アルキルメルカプ
20 タン縮合物、アルキルフェノール縮合物を挙げるができる。

HLB値が11以上13未満のポリアルキレンオキサイド誘導体の好ましい具体例として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノ
25 ニルフェニルエーテル等でHLB値が11以上13未満の化合物を挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

また、LDLのみに選択的に作用する界面活性剤として、陰イオン界面活性剤を挙げるができる。ここで用いられる陰イオン界面活性剤としては、特に限定さ

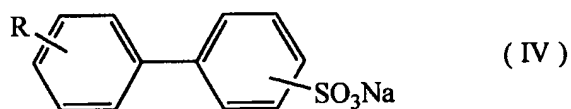
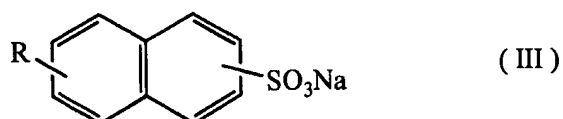
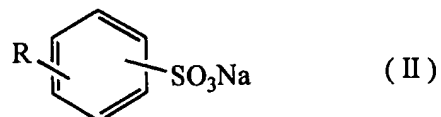
WO 98/47005

PCT/JP97/03663

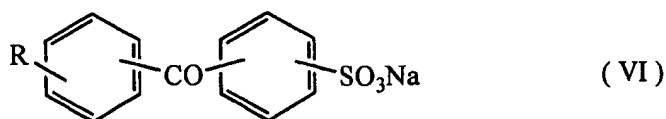
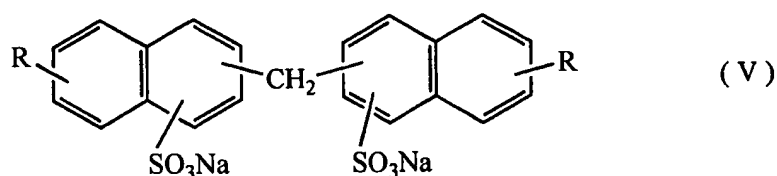
6

れないが、芳香環に炭素数 4 ～ 18 の直鎖状又は分枝状アルキル基が結合したものを有するものが好ましい。ここで、芳香環は、ベンゼン、ナフタレン、ジフェニール等のように炭素と水素のみから成るものが好ましい。さらに、上記芳香環にスルホン酸塩のような親水基が結合したものが好ましい。このような好ましい陰イオン界面活性剤の例を下記式 (II) ないし (VI) に示す。

5



10



15

但し、式 (II) ～ (VI) において、R はそれぞれ独立に炭素数 4 ～ 18 の直鎖状又は分枝状アルキル基を示す。また、第 2 工程で用いられる好ましい陰イオン界面活性剤として、高級アルコール硫酸ナトリウム等を挙げることができる。

第 2 工程で用いられる界面活性剤の濃度は、0.1 ～ 100 g/l 程度が好まし

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

7

く、さらに好ましくは1～50 g/l程度である。

第2工程のその他の好ましい反応条件は、第1工程における好ましい反応条件と同様である。

以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下

5 記実施例に限定されるものではない。

実施例 1

第1 試薬

	BES緩衝液、pH 6.0	100 mmol/L
	HDAOS:N-(2-ヒドロキシスルホプロピル)-3,5-	
10	ジメチオキシアニン	0.7 mmol/L
	シュードモナス属細菌由来コレステロールエステラーゼ (旭化成工業社製商品名「CEN」)	0.8 U/ml
	ストレプトミセス属細菌由来コレステロールオキシダーゼ (東洋紡績社製商品名「COO」)	0.5 U/ml
15	カタラーゼ	80 U/ml
	塩化マグネシウム	10 mmol/L
	花王社製エマルゲンB 6 6 (ポリオキシエチレン誘導体 (HLB=13.2))	0.2 %

20 第2 試薬

	BES緩衝液、pH 7.0	50 mmol/L
	4- アミノアンチピリン	4.0 mmol/L
	ペルオキシダーゼ	2.4 単位/ml
	アジ化ナトリウム	0.1%
25	花王社製エマルゲンA 6 0 (ポリオキシエチレン誘導体 (HLB=12.8))	5.0%

コレステロール濃度として100mg/dlに精製したHDL、LDL、VLDL、CMをそれぞれ含む4種類の試料各4 μlに、あらかじめ37℃で加温した第1試薬

300 μ l を混和し、37℃で 5 分間反応させた後に、第 2 試薬 100 μ l を加え 5 分間反応させ、600nm における吸光度を測定した。測定された吸光度からコレステロール量を算出し、試料中のコレステロール量との比を計算して捕捉率を求めた。結果を下記表 1 に示す。

5

表 1

捕捉率			
CM	VLDL	LDL	HDL
<1.0%	<5.0%	70.0 %	<1.0%

表 2 に示されるように、上記方法によれば、LDL 中のコレステロールはかなりの部分について捕らえているが、それ以外のリポ蛋白中コレステロールはほとんど捕らえておらず、LDL 中コレステロールを選択的に定量できることがわかる。

実施例 2

10

第 1 試薬

PIPES 緩衝液、pH 7.0	50 mmol/L
HDAOS	0.7 mmol/L
シュードモナス属細菌由来コレステロールエステラーゼ (旭化成工業社製商品名「CEN」)	0.8 U/ml
15 ストレプトミセス属細菌由来コレステロールオキシダーゼ (東洋紡績社製商品名「COO」)	0.5 U/ml
カタラーゼ	80 U/ml
塩化マグネシウム	10 mmol/L
花王社製エマルゲン B 6 6	0.2 %
20	
第 2 試薬	
PIPES 緩衝液、pH 7.0	50 mmol/L
4- アミノアンチピリン	4.0 mmol/L
ペルオキシダーゼ	2.4 単位/ml
25 アジ化ナトリウム	0.1%

Triton X 100

3. 0%

実施例 1 と同様な操作を行い各リポ蛋白との反応性を求めた。結果を下記表 2 に示す。

表 2

補捉率			
CM	VLDL	LDL	HDL
<1.0%	<5. 0%	71.0 %	<1.0%

5 実施例 3

試料として健常人血清を用い、実施例 1、2 の操作を行い、LDL コレステロール濃度を求めた。対照法として Friedewald の計算式 (CLIN. CHEM.、41、1414、1995) を用いて血清中の LDL コレステロール濃度を求めた。その結果を図 1 及び図 2 の相関図として示した。

10 図 1 及び図 2 に示されるように、両方法による定量結果は非常によく一致しており、本発明の方法により正確に LDL 中のコレステロールが定量できることが明らかになった。

実施例 4

第 1 試薬

15	グッド緩衝液、pH 7. 0	50 mmol/l
	HDAOS	0. 7 mmol/l
	コレステロールエステラーゼ	0. 8 U/ml
	コレステロールオキシダーゼ	0. 5 U/ml
	カタラーゼ	80 単位/ml
20	陽イオン界面活性剤 (ラウリルトリメチルアンモニウムクロライド)	0. 1%

第 2 試薬

	4 - アミノアンチピリン	4. 0 mmol/l
25	ペルオキシダーゼ	2. 4 単位/ml

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

10

アジ化ナトリウム 0.1%

非イオン界面活性剤（ポリオキシエチレン

ラウリルエーテル） 0.1%

（非イオン界面活性剤は第2反応に使用）

- 5 試料20 μ lに予め37°Cで加温した第1試薬180 μ lを混和し、37°Cで5分間反応させた後に、第2試薬を60 μ l加え5分間反応させ600 nmにおける吸光度を測定した。

- 図3はLDLコレステロール濃度と吸光度との関係を示すもので、HDL、VLDL及びCM存在下においてもLDLコレステロールを特異的かつ濃度依存的に測定できることを示している。
- 10

実施例5

- 試料として血清を用い、実施例4の操作を行いLDLコレステロール濃度を求めた。対照法としてFriedewaldの計算式（CLIN. CHEM., 41, 1414, 1995）を用いて血清中のLDLコレステロール濃度を求めた。その結果を表3に示す。表3に示すように、本発明の方法による結果はFriedewaldの計算式による結果と良好な相関を示した。
- 15

表3

	Fridewald	実施例4
検体 1	73.0	60.1
2	91.0	85.8
3	136.4	124.0
4	97.7	98.0
5	75.2	81.8
6	195.7	195.4
7	140.5	112.9
8	112.8	113.2
9	160.6	153.5
10	120.4	111.1

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

1 1

請求の範囲

1. 被検試料中の高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白及びカイロミクロン中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、低密度リポ蛋白、高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白及び／又はカイロミクロンを含むかもしれない被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法。
2. 前記第1工程は、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤の存在下において、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを用させ、生じた過酸化水素を消去することから成る、請求項1記載の方法。
3. 前記第2工程は、前記第1工程の産物に、少なくとも低密度リポ蛋白に作用する界面活性剤を加え、前記コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することから成る、請求項2記載の方法。
4. 前記少なくとも低密度リポ蛋白と作用する界面活性剤は、全てのリポ蛋白に作用するものである請求項3記載の方法。
5. 前記第1工程で用いられる、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤は、HLB値が13以上15以下であるポリアルキレンオキサイド誘導体である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。
6. 前記第2工程で用いられる、全てのリポ蛋白に作用する界面活性剤は、HLB値が11以上13未満であるポリアルキレンオキサイド誘導体である請求項4記載の方法。
7. 前記第1工程で用いられる、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤は陽イオン界面活性剤である、請求項2記載の方法。
8. 前記陽イオン界面活性剤は第4級アンモニウム塩を有する請求項7記載の方法。
9. 前記第2工程で用いられる、少なくとも低密度リポ蛋白に作用する界面活性剤は陰イオン界面活性剤である請求項3記載の方法。
10. 前記第1工程は、前記界面活性剤濃度を0.1～10g/lとして行われ

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

1 2

る請求項 2 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

1 1. 前記第 2 工程は、H L B 値が 1 1 以上 1 3 未満である前記ポリオキシアルキレン誘導体又は前記陰イオン界面活性剤の濃度を 1 ~ 1 0 0 g / l として行われる請求項 6 又は 9 記載の方法。

5 1 2. 前記第 1 及び第 2 の工程は、p H 5 ~ 8 の緩衝液中で行なわれる請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

1 3. 前記緩衝液はアミンを含む請求項 1 2 記載の方法。

1 4. 上記第 1 及び第 2 工程は、温度 2 5 ~ 4 0 °C で行なう請求項 1 ないし 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

1/2

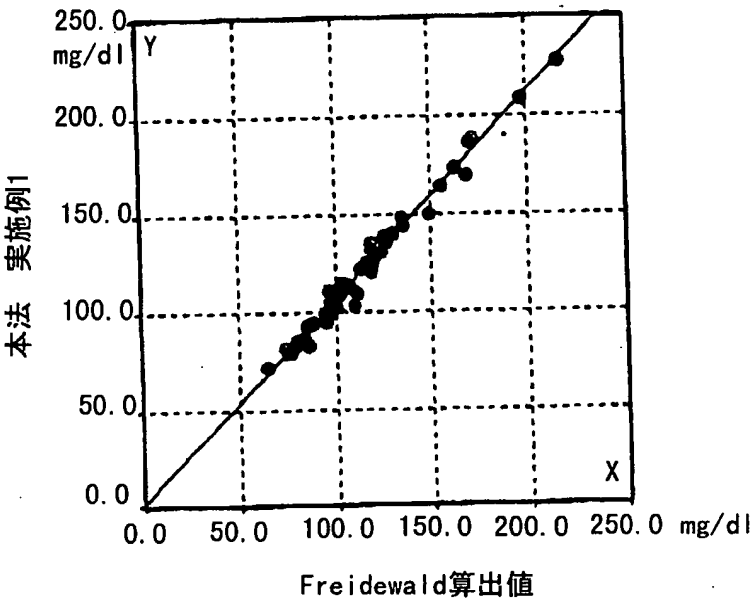


図 1

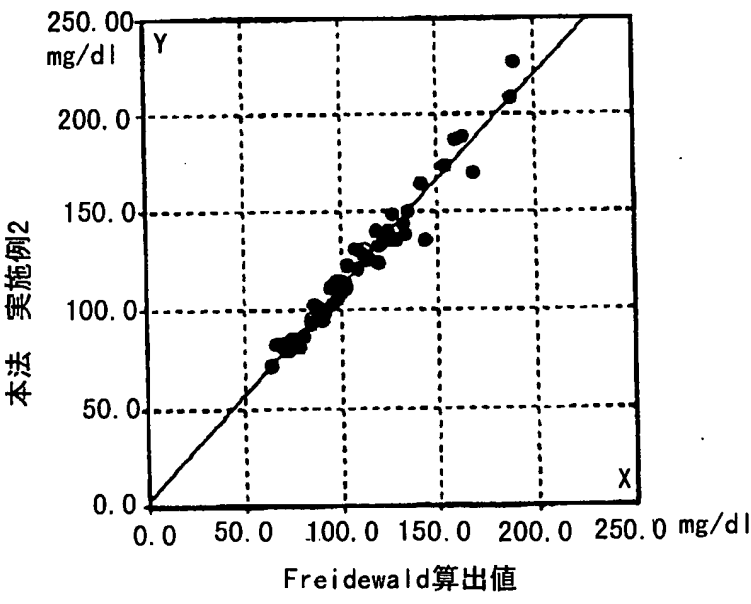


図 2

WO 98/47005

PCT/JP97/03663

2/2

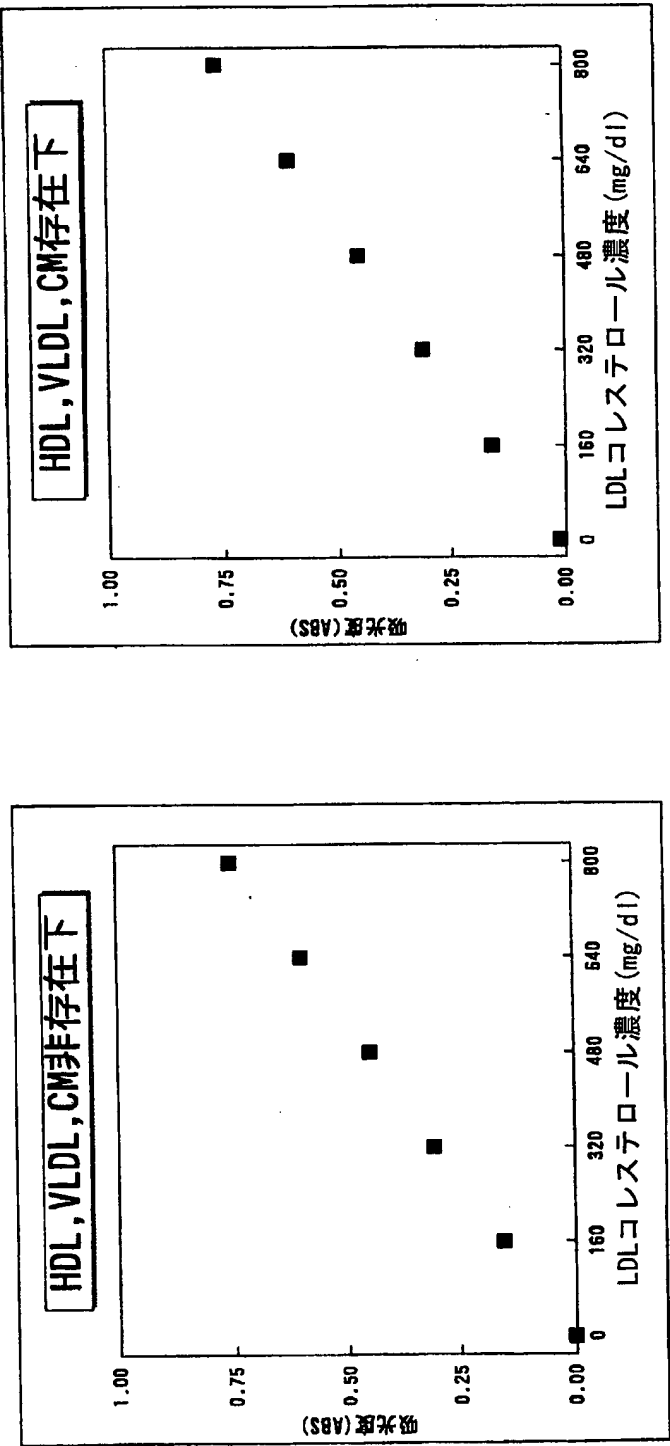


図 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, PREVIEWS, CAS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-30136, A (Kyowa Medex Co., Ltd.), November 14, 1995 (14. 11. 95), Full text ; Figs. 1, 2 & WO, 95/24647, A & AU, 95/18620, A	1-14
A	JP, 9-299, A (International Reagents Corp.), January 7, 1997 (07. 01. 97), Full text & WO, 97/00971, A	1-14
A	JP, 7-501945, A (ActiMed Laboratories, Inc.), March 2, 1995 (02. 03. 95), Full text & US, 5286626, A & FI, 942763, A & NO, 942197, A & EP, 619885, A & US, 5411870, A & AU, 661097, A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
December 26, 1997 (26. 12. 97)Date of mailing of the international search report
July 21, 1998 (21. 07. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 97/03663	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ G01N33/92			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ G01N33/92			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-1998年 日本国登録実用新案公報 1994-1998年 日本国実用新案登録公報 1996-1998年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS PREVIEWS CAS(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	J P, 7-30136, A (協和メディックス株式会社) 14. 1 1月. 1995 (14. 11. 95) 全文, 図1, 2 & WO, 95/24647, A & AU, 9 5/18620, A	1-14	
A	J P, 9-299, A (国際試薬株式会社) 7. 1月. 1997 (07. 01. 97) 全文, & WO97/00971, A	1-14	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 26. 12. 97		国際調査報告の発送日 21.07.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 黒田浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 97/03663
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 7-501945, A (アクティムド ラボラトリーズ, イ ンコーポレーテッド) 2. 3月. 1995 (02. 03. 95) 全文, & US, 5286626, A & FI, 942763, A & NO, 942197, A & EP, 619885, A & US, 5411870, A & AU, 661097, A	1-14